

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-336386

(43) 公開日 平成8年(1996)12月24日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/06			C 1 2 N 9/06	B
C 1 2 Q 1/26		7823-4B	C 1 2 Q 1/26	
1/54		7823-4B	1/54	
// (C 1 2 N 9/06				
C 1 2 R 1:80)				

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-86427

(22) 出願日 平成8年(1996)4月9日

(31) 優先権主張番号 特願平7-85261

(32) 優先日 平7(1995)4月11日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 加藤 暢夫

京都府亀岡市西つつじヶ丘美山台2丁目3番18号

(72) 発明者 阪井 康能

滋賀県大津市本宮2丁目40-8

(72) 発明者 谷 ▲吉▼樹

京都府京都市北区上賀茂菟淵園町56, 60番  
合地-1

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼおよびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 新たな臨床分析および食品分析法を開発する。

【解決手段】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するペニシリウム属 (*Penicillium*) の菌をフルクトシルリジン及び/又はフルクトシルN<sup>α</sup>-Z-リジン含有培地で培養することにより産生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、ペニシリウム属の菌を培養し、培養物から酵素を分離することからなる該酵素の製造方法、該F A O Dを用いるアマドリ化合物の分析法、該分析法のための試薬およびキット。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するペニシリウム属 (*Penicillium*) の菌をフルクトシルリジン含有培地で培養することにより産生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項 2】 フルクトシルリジン含有培地が、グルコースと、リジン及び／又は  $N^{\circ}$ -Z-リジンを温度 100～150℃において 3～60 分間オートクレーブ処理することにより得られる、フルクトシルリジンを含有するものである請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項 3】 フルクトシルバリン及び／又はフルクトシルリジンに対する活性を有する請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項 4】 ペニシリウム属の菌が、ペニシリウム・ヤンシネルム S-3413 (*Penicillium janthinellum* S-3413) (FERM BP-5475)、ペニシリウム・ヤンシネルム (IFO NO. 4651, 6581, 7905) (*Penicillium janthinellum*)、ペニシリウム・オキサリウム (IFO NO. 5748) (*Penicillium oxalicum*)、ペニシリウム・ヤバニウム (IFO NO. 7994) (*Penicillium javanicum*)、ペニシリウム・クリソゲナム (IFO NO. 4897) (*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シアネウム (IFO NO. 5337) (*Penicillium cyaneum*) からなる群から選択されるものである請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項 5】 下記の理化学的特性を有するものである請求項 1～4 のいずれかに記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：

- 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 $\alpha$ -ケトアルデヒド、アミン誘導体および過酸化水素を生成する反応を触媒し；
- 2) 安定 pH は 4.0～11.0、至適 pH は 7.5 であり；
- 3) 安定温度は 15～50℃、至適温度は 25℃であり；
- 4) スーパーデックス 200 pg を用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約 38,700 (38.7 kDa) である。

【請求項 6】 ペニシリウム・ヤンシネルム S-3413 (*Penicillium janthinellum* S-3413) (FERM BP-5475)。

【請求項 7】 遊離又は保護基を有するアミノ酸の糖化物及び／又はタンパクの糖化物を含有する培地で、ペニシリウム属の菌を培養することによって該菌類にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生させることを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法。

【請求項 8】 ペニシリウム属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生することができる菌株をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル  $N^{\circ}$ -Z-リジン含有培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする請求項 7 記載

の方法。

【請求項 9】 アマドリ化合物を含有する試料と、請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを接触させ、酸素の消費量または過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法。

【請求項 10】 試料が生体成分であり、アマドリ化合物の分析が、該生体成分中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトシルアミンの定量によりなされることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】 請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含有するアマドリ化合物の分析試薬又はキット。

【請求項 12】 生体成分中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトシルアミンの定量のために用いられることを特徴とする請求項 11 記載の分析試薬又はキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼに関し、さらに詳しくはペニシリウム属 (*Penicillium*) の菌由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、該酵素の製造方法、該酵素を用いたアマドリ化合物の分析法、および該酵素を含有する試薬及びキットに関する。

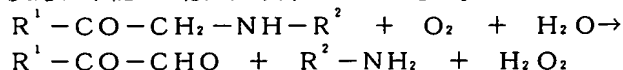
## 【0002】

【従来技術】 アマドリ化合物は、タンパク質、ペプチドおよびアミノ酸のようなアミノ基を有する物質と、アルドースのような還元性の糖が共存する場合、アミノ基とアルデヒド基が非酵素的かつ非可逆的に結合し、アマドリ転移することにより生成される。アマドリ化合物の生成速度は、反応性物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表される。従って、その生成量から、それら反応性物質を含有する物質に関する様々な情報を得ることができると考えられている。アマドリ化合物を含有する物質としては、醤油等の食品、および血液等の体液がある。例えば、生体では、グルコースとアミノ酸が結合したアマドリ化合物であるフルクトシルアミン誘導体が生成している。例えば、血液中のヘモグロビンが糖化されたフルクトシルアミン誘導体はグリコヘモグロビン、アルブミンが糖化された誘導体はグリコアルブミン、フルクトシルアミン誘導体のアルカリ溶液中における還元能はフルクトサミンと呼ばれる。これらの血中濃度は、過去の一定期間の平均血糖値を反映しており、その測定値は、糖尿病の病状の診断及び症状の管理の重要な指標となり得るために、測定手段の確立は临床上、極めて有用である。また、食品中のアマドリ化合物を定量することにより、その食品の製造後の保存状況や期間を知ることができ、品質管理に役立つと考えられる。このように、アマドリ化合物の定量分析は医学および食品を含む広範な分野で有用である。

【0003】従来、アマドリ化合物の定量法としては、高速液体クロマトグラフィーを利用する方法 [Chromatogr. Sci. 10:659(1979)]、ホウ酸を結合させた固体をつめたカラムを用いる方法 [Clin. Chem. 28:2088-2094(1982)]、電気泳動 [Clin. Chem. 26:1598-1602(1980)]、抗原-抗体反応を利用する方法 [J. J. C. L. A. 18: 620(1993)]、機器・試薬 16: 33-37(1993)]、フルクトサミンの測定法 [Clin. Chim. Acta 127: 87-95 (1982)]、チオバルビツール酸を用いて酸化後比色定量する方法 [Clin. Chim. Acta 112: 197-204 (1981)]などが知られているが、高価な機器が必要であったり、必ずしも正確で迅速な方法ではなかった。

【0004】近年、酵素の有する特性（基質、反応、構造、位置などの特異性）に起因して、選択的に目的物質を迅速かつ正確に分析することができることから、酵素反応を利用する方法が臨床分析や食品分析の分野で普及してきた。既に、アマドリ化合物に酸化還元酵素を作用させ、その反応における酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することにより、アマドリ化合物を定量する分析法が提案されている（例えば、特公平5-33997号公報、特公平6-65300号公報、特開平2-195900号公報、特開平3-155780号公報、特開平4-4874号公報、特開平5-192193号公報、特開平6-46846号公報、特開平7-289253号公報）。さらに、糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量法も開示されている（特開平2-195899号公報、特開平2-195900号公報、特開平5-192193号公報、特開平6-46846号公報、特開平7-289253号公報）。

【0005】アマドリ化合物の酸化還元酵素による分解反応は下記の一般式で表すことができる。



（式中、 $R^1$ はアルドース残基、 $R^2$ はアミノ酸、タンパク質またはペプチド残基を表す）

上記の反応を触媒する酵素として以下のものが知られている。

1. フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属（特公平5-33997号公報、特公平6-65300号公報）、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)（特開平3-155780号公報）
2. フルクトシルアミンデグリカーゼ：カンジダ属 (*Candida*)（特開平6-46846号公報）
3. フルクトシルアミノ酸分解酵素：ペニシリウム属 (*Penicillium*)（特開平4-4874号公報）。
4. ケトアミノオキシダーゼ：コリネバクテリウム属、フサリウム属、アクレモニウム属またはデブリオマイセス属（特開平5-192193号公報）
5. アルキルリジナーゼ：J. Biol. Chem. 239巻、第 3790-3796頁（1964年）記載の方法で調製。

### 【0006】

【発明が解決すべき課題】しかしながら、これらの酵素による方法には、下記の問題点があった。即ち、糖尿病の診断における指標は、糖化アルブミン、糖化ヘモグロビンおよびフルクトサミンである。糖化アルブミンは、タンパク分子中のリジン残基のε位にグルコースが結合して生成される [J. Biol. Chem. 261:13542-13545(1986)]。糖化ヘモグロビンは、ヘモグロビンβ鎖のN末端バリンにもグルコースが結合している [J. Biol. Chem. 254:3892-3898(1979)]。従って、糖尿病の指標となる糖化タンパクの測定には、フルクトシルリジンおよびフルクトシルバリンに対する特異性の高い酵素を用いる必要があった。しかし、既存のコリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素は、糖化タンパク又はその加水分解物に対する作用については明らかにされていない。他方、特開平5-192193号公報記載のケトアミノオキシダーゼはフルクトシルバリンを分解し得る酵素であり、リジン残基に糖が結合している糖化タンパクを正確に測定することができない。フルクトシルアミンデグリカーゼは、ジフルクトシルリジンに高い活性があるので、リジン残基のε位の糖化物を特異的に測定することができず、また、バリン残基の糖化物を特異的に測定することもできない。さらに、アルキルリジナーゼを用いる方法は糖類以外がリジンに結合した物質に対しても作用し、糖化物に対する特異性が低いという問題があり、正確な測定が期待できなかった。特開平4-4874号記載のペニシリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンとフルクトシルアラニンに作用する酵素である。このように、従来の酵素は糖化タンパクの正確な定量には適さず、フルクトシルリジン及びフルクトシルバリンに対する特異性が高い酵素の開発が待たれていた。

【0007】一般的に、酵素を用いる分析法が正確かつ有用となるためには、分析の目的に最適な酵素を選択する必要がある。即ち、酵素の基質である被検物質の種類、測定試料の状態、測定条件など、種々の条件を考慮して適切な酵素を用いなければ、再現性のある正確な分析を行う事ができない恐れがある。そのような酵素を選択するためには、予め様々な酵素について、活性、基質特異性、温度安定性、pH安定性などが特定されていなければならない。従って、より多くのフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを製造し、それらの特性を明らかにしておくことが望ましい。

### 【0008】

【課題を解決する手段】本発明者らは、アマドリ化合物、特に糖化タンパクに特異的に作用する新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供することを目的として鋭意研究を重ねた結果、ペニシリウム属 (*Penicillium*) の菌をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシルN<sup>ε</sup>-Z-リジンの存在下で培養すると、目的の活性を

有する酵素が誘導されることを見だし、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、ペニシリウム属 (*Penicillium*) の菌を、フルクトシルリジン及び／又はフルクトシル  $N^{\circ}$ -Z-リジン含有培地で培養することにより産生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供するものである。

【0009】本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌の培養に用いるフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル  $N^{\circ}$ -Z-リジン含有培地は、グルコースと、リジン及び／又は  $N^{\circ}$ -Z-リジンを温度 100 ~ 150℃において 3~60 分間、オートクレーブ処理することにより得られるフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル  $N^{\circ}$ -Z-リジン (以下、FZL と略称することもある) を含有する。後述するように、本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼはフルクトシルバリンおよびフルクトシルリジンの両者に活性があるが、その活性は、前者に対する活性が後者に対するものよりも高いという特徴を有する。本明細書中では、本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを FAOD と称することもある。

【0010】本発明の酵素は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するペニシリウム属の菌をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル  $N^{\circ}$ -Z-リジン含有培地で培養することにより製造することができる。そのような菌として、ペニシリウムヤンシネルム S-3413 (*Penicillium janthinellum* S-3413) (FERM BP-5475)、ペニシリウム・ヤンシネルム (IFO NO. 4651, 6581, 7905) (*Penicillium janthinellum*)、ペニシリウム・オキサリクム (IFO NO. 5748) (*Penicillium oxalicum*)、ペニシリウム・ヤバニクム (IFO NO. 7994) (*Penicillium javanicum*)、ペニシリウム・クリソゲナム (IFO NO. 4897) (*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シアネウム (IFO NO. 5337) (*Penicillium cyaneum*) などの種を挙げることができる。

【0011】本発明の FAOD 類は、一般に、下記の理化学的特性を有する。

- 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 $\alpha$ -ケトアルデヒド、アミン誘導体および過酸化水素を生成する反応を触媒し；
- 2) 安定 pH は 4.0 ~ 11.0、至適 pH は 7.5 であり；
- 3) 安定温度は 15 ~ 50℃、至適温度は 25℃であり；
- 4) スーパーデックス 200 pg を用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約 38,700 (38.7 kDa) である。

【0012】本発明の FAOD の製造に用いるフルクトシルリジン及び／又は FZL は、グルコース 0.01 ~ 50 重量% とリジン及び／又は  $N^{\circ}$ -Z-リジン 0.01 ~ 20 重量% とを溶液中で、100 ~ 150℃におい

て 3 ~ 60 分間オートクレーブ処理する方法で製造される。具体的には、全量 1000 ml の溶液中にグルコース 200 g、 $N^{\circ}$ -Z-リジン 10 g を溶解させ、通常 120℃、20 分間オートクレーブ処理することによって製造することができる。また、本発明の FAOD の製造に用いるフルクトシルリジン及び／又は FZL 含有培地 (以下、FZL 培地と称する) は、上記の方法で得られたフルクトシルリジン及び／又は FZL を通常の培地に添加するか、例えば、グルコース 0.01 ~ 50 重量%、リジン及び／又は  $N^{\circ}$ -Z-リジン 0.01 ~ 20 重量%、 $K_2HPO_4$  0.1 重量%、 $NaH_2PO_4$  0.1 重量%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 重量%、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.01 重量% および酵母エキス 0.2 重量% を含有する混合物 (好ましくは pH 5.6 ~ 6.0) を 100 ~ 150℃において 3 ~ 60 分間オートクレーブ処理することによって得ることができる。

【0013】本発明の FAOD の製造に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養源を含有する通常の合成あるいは天然の培地であってよく、炭素源としては、例えば、グルコース、キシロース、グリセリン等、窒素源としては、ペプトン、カゼイン消化物、酵母エキス、等を用いることができる。さらに無機物としてはナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、マグネシウム、コバルト等、通常の培地に含有されるものを用いることができる。本発明の FAOD は、フルクトシルリジン及び／又は FZL を含有する培地で培養したとき、最もよく誘導される。好ましい培地の例として、上記の方法で得られる FZL を単一の窒素源とし、炭素源としてグルコースを用いる FZL 培地 (1.0% グルコース、0.5% FZL、1.0%  $K_2HPO_4$ 、0.1%  $NaH_2PO_4$ 、0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.01%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  および 0.01% ビタミン混合物) を挙げることができる。特に好ましい培地は、全量 1,000 ml 中にグルコース 20 g (2%)、FZL 10 g (1%)、 $K_2HPO_4$  1.0 g (0.1%)、 $NaH_2PO_4$  1.0 g (0.1%)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g (0.05%)、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 g (0.01%) および酵母エキス 2.0 g (0.2%) を含有する培地 (pH 5.6 ~ 6.0) である。FZL 培地は、通常の培地に FZL を添加するか、グルコースと  $N^{\circ}$ -Z-リジンとを含有する培地をオートクレーブ処理することによって調製することができる。いずれの方法によっても得られる培地はフルクトシルリジン及び／又は FZL の存在によって褐色を呈しており、FZL 褐変培地又は GL (グリケーテッドリジン及び／又はグリケーテッド  $N^{\circ}$ -Z-リジン) 褐変培地と呼称される。

【0014】培養は、通常、25 ~ 37℃、好ましくは 28℃で行われる。培地の pH は 4.0 ~ 8.0 の範囲であり、好ましくは 5.5 ~ 6.0 である。しかしながら、これらの条件はそれぞれの菌の状態に応じて適宜調整さ

れるものであり、上記に限定されない。例えば、ペニシリウム・ヤンシネルム S-3413 株をこの条件下、20~48 時間、好ましくは 36 時間培養すると、FAOD が培養培地に蓄積される(図 1)。このようにして得られた培養物は、常法に従い、核酸、細胞壁断片等を除去し、酵素標品を得ることができる。本発明の FAOD の酵素活性は菌体中に蓄積されるので、培養物中の菌を破碎し、酵素を抽出する。細胞の破碎は、機械的手段または溶媒を利用した自己消化、凍結、超音波処理、加圧などのいずれでもよい。酵素の分離精製方法も既知であり、硫酸などを用いる塩析、エタノール等の有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィーなどを組み合わせて精製する。例えば、培養物を、遠心または吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、ダイノミルによって菌糸体を破碎する。次いで、遠心分離した上清を無細胞抽出液として、硫酸分画、DEAE-セファセルイオン交換クロマトグラフィーで処理することにより精製する。

【0015】しかしながら、本発明の目的から、FAOD は、その精製度にかかわらず、アマドリ化合物の酸化反応を触媒することができる限り、培養液をはじめとする、あらゆる精製段階の酵素含有物及び溶液を包含する。また、酵素分子の内、触媒活性に関与する部位のみでも、本発明目的を達成することができることから、任意の、アマドリ化合物酸化活性を有するフラグメントをも包含するものとする。このようにして得られた FAOD は、アマドリ化合物の定量、特に糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量に有用である。従って、本発明は、ペニシリウム属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生することができる菌株をフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N<sup>α</sup>-Z-リジン含有培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。

【0016】本発明の FAOD を産生する菌の内、ペニシリウム・ヤンシネルム S-3413 (*Penicillium janthinellum* S-3413) (以下、S-3413 株と称する) は本発明者らが土壤中より新規に単離した菌株である。本菌株について、宇田川俊一ら著の「菌類図鑑」(講談社サイエンティフィック 1993) を参考とし、その菌学的特性を検討した結果、以下の根拠よりペニシリウム・ヤンシネルム (*Penicillium janthinellum*) と同定した。なお、本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号 FERM BP-5475 の下で寄託されている。

(1) 子のう世代を形成しない。

(2) ペニシリ (penicillus) 形成が認められた。

(3) フィアライド (phialide) はとっくり型で、急に細まり長い先端となる。

(4) ペニシリは不規則に分枝し、散開型である。

(5) 菌核を形成しない。

(6) 分生子連鎖が著しく散開である。

さらに、

(7) 培地における生育状況

Czapek 寒天培地上で速やかに生育する。25℃ の恒温器で 10 日間培養すると、羊毛状に広がり、淡黄色または灰緑色を呈する。また、放射状に深いしわを形成する。

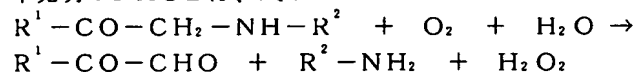
【0017】以下に本発明の FAOD の特性を詳細に説明する。

#### 1. 一般的な誘導特性

本発明の FAOD はフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N<sup>α</sup>-Z-リジン (FZL) によって誘導される誘導酵素であり、フルクトシルリジン及び/又は FZL を窒素源とし、グルコースを炭素源とするフルクトシルリジン及び/又は FZL 培地で、ペニシリウム属のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌株を培養することにより産生される。FAOD は、グルコースとリジン及び/又は N<sup>α</sup>-Z-リジンを共にオートクレープして得られる GL 褐変培地で誘導されるが、グルコースとリジン及び/又は N<sup>α</sup>-Z-リジンを別々にオートクレープ処理して調製した培地では誘導されないことから、該酵素はアマドリ化合物に特異的に作用するものである。

#### 【0018】2. 反応特異性および基質特異性

本発明の FAOD は、式：



(式中、R<sup>1</sup> はアルドース残基、R<sup>2</sup> はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す) で示される反応における触媒活性を有する。上記の反応式において、R<sup>1</sup> が -OH、- (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、-、または - [CH (OH)]<sub>n</sub> - C H<sub>2</sub> OH (式中、n は 0-6 の整数) であり、R<sup>2</sup> が -C H R<sup>3</sup> - [CONH R<sup>3</sup>] . COOH (式中、R<sup>3</sup> は α-アミノ酸側鎖残基、m は 1-480 の整数を表す) で示されるアマドリ化合物が基質として好ましい。中でも、R<sup>3</sup> が リジン、ポリリジン、バリン、アスパラギンなどから選択されるアミノ酸の側鎖残基であり、また n が 5~6、m が 55 以下である化合物が好ましい。

【0019】本発明の FAOD の各基質に対する活性を、以下の表 1 に示す。

表 1 精製されたペニシリウム・ヤンシネルム S-3413 由来の FAOD の基質特異性

【表 1】

基質	濃度	比活性 (%)
N <sup>+</sup> -フルクトシルN <sup>+</sup> -Z-リジン	1.67mM	22.4
フルクトシルバリン	1.67mM	100
N <sup>+</sup> -メチル-L-リジン	1.67mM	N. D. * <sup>1</sup>
グリコヘモグロビン	0.17%	N. D.
トリブチックグリコヘモグロビン	0.17%	0.2
FHSA* <sup>2</sup>	0.17%	N. D.
トリブチックFHSA	0.17%	0.5

\*\*1: 検出されず

\*2: フルクトシルヒト血清アルブミン

表1から、本発明のFAODはフルクトシルN<sup>+</sup>-Z-リジン及びフルクトシルバリンに対して高い特異性を有する。ペニシリウム属のFAOD産生能力を有する菌株を下記表2に例示する。

表2 FZL褐変培地で培養したペニシリウム属の菌から抽出したFAODの基質特異性

【表2】

10

\*

菌株No.	菌株名	比活性 (10 <sup>-2</sup> U/mg-protein)	
		フルクトシルN <sup>+</sup> -Z-リジン	フルクトシルバリン
FERM BP-5475	ペニシリウム・ヤンシネルムS-3413	3.0	17.3
IFO 4651	ヤンシネルム	0.3	0.5
IFO 6581	ヤンシネルム	N. D. <sup>1)</sup>	0.2
IFO 7905	ヤンシネルム	0.3	0.5
IFO 5748	オキサリウム	3.0	16.2
IFO 7994	ヤバニウム	2.8	12.0
IFO 4897	クリンゲナム	1.8	11.3
IFO 5337	シアネウム	6.1	21.9

1): 検出されず

【0020】表2に示されているように、本発明のFAODは、フルクトシルリジンと比較してフルクトシルバリンに対して高い活性を有しており、このことは該FAODが糖化ヘモグロビンの測定に有用であることを示唆するものである。

【0021】3. pHおよび温度の条件

pH条件の測定

0.1M酢酸(Ac)、リン酸カリウム(K-P)緩衝液、トリス-塩酸緩衝液およびグリシン(Gly)-NaOH緩衝液(pH4.0~11.0)にFAODを加え、25℃、10分間インキュベートした後、通常条件(25℃、pH8.0)で活性を測定した。上記方法で測定したとき、本発明のFAODの安定なpH域は、約pH4.0~11.0、好ましくはpH6.0~9.0であり、至適pHは約7.5であった(図2参照)。

温度条件の測定

50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)中で15~60℃の温度条件にFAODを加え、10分間インキュベートした後、通常条件で活性を測定した。安定な温度領域は15~50℃、好ましくは15~45℃、より好ましくは15℃であり、酵素反応は、15~45℃、好ましくは15~40℃、より好ましくは25℃で効率良く進行する。(図3参照)

【0022】4. 力価の測定

酵素の力価測定は下記の方法で行った。

(1) 生成する過酸化水素を比色法により測定する方法。

A. 速度法

100mMフルクトシルバリン(FV)溶液はあらかじめ得られたFVを蒸留水で溶解することによって調製した。45mM 4-アミノアンチピリン、60ユニット/mlパーオキシダーゼ溶液、及び60mMフェノール溶液それぞれ100μlと、0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)1ml、および酵素溶液50μlを混合し、全量を蒸留水で2.95mlとする。25℃で平衡化した後、100mM FV溶液50μlを添加し、505nmにおける吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数(5.16×10<sup>3</sup>M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位(ユニット:U)とする。

【0023】B. 終末法

上記A法と同様に処理し、基質添加後、30分間25℃でインキュベートした後の505nmにおける吸光度を測定し、別にあらかじめ標準過酸化水素溶液を用いて作成した検量線から生成した過酸化水素量を算出することにより、酵素活性を測定する。

(2) 酵素反応による酸素吸収を測定する方法

50 0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)1mlと酵素

溶液 50  $\mu$ l を混合し、蒸留水で全量を 3.0 ml とし、ラング プラザーズ社の酸素電極のセルに入れる。25℃で攪拌し、溶存酸素と温度を平衡化した後、50 mM FV 100  $\mu$ l を添加し、酸素吸収を記録計で連続的に計測し、初速度を得る。標準曲線から 1 分間に吸収された酸素量を求め、これを酵素単位とする。

【0024】5. 酵素の阻害、活性化および安定化

(1) 金属の影響

0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) の条件で、終濃度 1 mM の各種金属イオンを添加し、5 分間 30℃でインキュベートした後、活性を測定した。結果を下記の表 3 に示す。

表 3 金属イオンのペニシリウム・ヤンシネルム S-3413 由来 FAOD 活性への影響

【表 3】

原料 (1 mM)	比活性 (%)
なし	100
LiCl	88
KCl	103
NaCl	100
RbCl	105
CsCl	103
MgCl <sub>2</sub>	103
CaCl <sub>2</sub>	74
MnCl <sub>2</sub>	144
FeSO <sub>4</sub>	114
CoSO <sub>4</sub>	13
CuCl <sub>2</sub>	51
ZnSO <sub>4</sub>	5.8
AgNO <sub>3</sub>	5.7
BaCl <sub>2</sub>	66
HgCl <sub>2</sub>	2.1
FeCl <sub>3</sub>	100

表 3 から明らかに、本発明の FAOD の活性に対し、銅イオン、バリウムイオンが阻害的であり、コバルトイオン、亜鉛イオン、銀イオンおよび水銀イオンは強く阻害する。

【0025】(2) 各種阻害物質の影響

上記 (1) の金属イオンの影響に関する試験と同様の方法で試験した。ただし、パラクロロ安息香酸第二水銀 (PCMB) は終濃度 0.1 mM、それ以外は 1 mM とした。結果を表 4 に示す。安定化の検討は、50 mM リ

ン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に 0.1 mM のジチオスイトール (DTT) を添加したものに対して一晚透析を行った後、活性を測定することにより行った。

表 4 各種物質の FAOD 活性への影響

【表 4】

試薬 (1 mM)	比活性 (%)
なし	100
PCMB* <sup>1</sup>	0.69
DTNB* <sup>2</sup>	13
ヨード酢酸	102
アジ化ナトリウム	118
$\alpha$ , $\alpha'$ -ジピリジル	105
O-フェナンスロリン	111
セミカルバジド	103
フェニルヒドラジン	0.17
ヒドラジン	12
ヒドロキシルアミン	18
デブレニル	107
アミノグアニジン	63
EDTA* <sup>3</sup>	109

\*1: PCMB, パラクロロ安息香酸第二水銀

\*2: DNTB, 5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)

\*3: EDTA, エチレンジアミン四酢酸

表 4 から明らかに、FAOD 活性は PCMB、DNTB、ヒドラジン、フェニルヒドラジン、ヒドロキシルアミンにより、強く阻害され、酵素反応には SH 基およびカルボニル基が重要な働きをしていることが予想される。他方、ジチオスイトールによって安定化され、保存に適した溶媒はジチオスイトール 0.1 mM を添加した 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) である。

【0026】6. 分子量

スーパーデックス 200 pg によるゲルろ過法で求めた結果、分子量は約 38,700 (38.7 kDa) であった (図 4)。SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動) はデビスの方法に従い、10%ゲルを用いて、40 mA で、3 時間泳動し、タンパク染色は、クマシーブリリアントブルー G-250 で行った。また、SDS-PAGE において、標準タンパクとしてホスホリラーゼ B、牛血清アルブミン、オボアルブミン、カルボニックアンヒドラーゼ、大豆トリブシンインヒビターを同様に泳動し、検量線を用いて分子量測定を行った結果、サブユニットの分子量は

約 48,700 (48.7 kDa) であることが示された (図 5)。従って、本発明の FAD は単量体であることが明らかである。

#### 【0027】7. 既知の酵素との比較

既存の菌由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、本\*

\* 発明の FAD とを比較した。

表 5 種々の微生物由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの比較

【表 5】

産生菌	ペニシリウム・ヤソニカム S-3413	コリネバクテリウム sp. <sup>1)</sup>	アスペルギルス s. p. <sup>2)</sup>
分子量			
(ゲルろ過)	38.700	88.000	83.000
(SDS-PAGE)	48.700	44.000	43.000
補酵素	FAD と共有結合	FAD と非共有結合	FAD と非共有結合
基質特異性 (U/mg・タンパク)			
(フルクトシルリジン)	3.0 <sup>3)</sup>	N. D. <sup>4)</sup>	11.28 <sup>4)</sup>
(フルクトシルバリン)	17.3	7.09	59.8
至適 pH	7.5	8.3	7.7
至適温度 (°C)	25	40	40
SH 試薬による影響	あり	なし	あり

1) : ホリウチら (T. Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110 (1989)

2) : ホリウチら (T. Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338 (1991)

3) : フルクトシル N<sup>α</sup>-Z-リジンに対する比活性

4) : N<sup>α</sup>-D-フルクトシル N<sup>α</sup>-ホルミルリジンに対する比活性

表 5 から、本発明の FAD と他の 2 種の菌株由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの間に、下記の相違点が認められる。

(1) 分子量の相違 : 本発明の FAD は単量体であるのに対し、他の 2 種の酵素は 2 量体であり、明らかに異なる。

(2) 補酵素 : FAD は補酵素として共有結合的に結合した FAD を有するのに対し、他の酵素はいずれも非共有結合的に結合した FAD を有する。

(3) 至適 pH、至適温度、および SH 試薬による阻害等の差異は FAD と他の 2 酵素との相違を示している。

【0028】さらに、特開平 4-4874 号公報記載のペニシリウム属由来フルクトシルアミノ酸分解酵素と、本発明の FAD とを比較すると、下記の相違点が認められる。

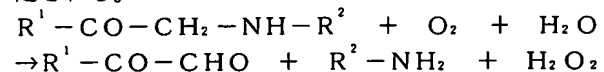
(1) 基質特異性 : 特開平 4-4874 号公報記載のフルクトシルアミノ酸分解酵素はフルクトシルリジンとフルクトシルアラニンに活性を有するのに対し、本発明の FAD はフルクトシルリジンとフルクトシルバリンに活性を有し、活性はフルクトシルバリンに対する方が強い。

(2) 誘導条件 : 特開平 4-4874 号公報記載のフルクトシルアミノ酸分解酵素はフルクトシルアミノ酸を含

まない培地でも産生されるが、本発明の FAD はフルクトシルリジンを含む培地で培養することによって誘導される。

(3) 製造方法 : 本発明の FAD は褐変培地を用いて培養し、製造する。

【0029】既述のごとく、本発明の酵素 FAD は、アマドリ化合物の定量に有用である。従って、本発明はまた、アマドリ化合物を含む試料と、本発明の FAD とを接触させ、酸素の消費量または過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法を提供するものである。本発明の分析法は、生体成分中の糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトシルアミンの定量に基づいて行われる。FAD の酵素活性は下記の反応に基づいて測定される。



(式中、R<sup>1</sup> はアルドース残基、R<sup>2</sup> はアミノ酸、タンパク質またはペプチド残基を表す)

被検液としては、アマドリ化合物を含む任意の試料溶液を用いることができ、例えば、血液 (全血、血漿または血清)、尿等の生体由来の試料の外、醤油等の食品が挙げられる。

【0030】本発明の FAD をアマドリ化合物含有溶液に、適当な緩衝液中で作用させる。反応溶液の pH、温度は、上記の条件を満たす範囲、即ち、pH 6.0~9.0、好ましくは 7.5、温度は 15~45℃、好ましくは 15~40℃である。緩衝液としてはリン酸カリウム等を用いる。FAD の使用量は、終点分析法においては通常、0.1 ユニット/ml 以上、好ましくは 1~100 ユニット/ml である。



【0031】本発明の分析法では、下記のいずれかのアマドリ化合物の定量法を用いる。

#### (1) 過酸化水素発生量に基づく方法

当該技術分野で既知の過酸化水素の定量法、例えば、発色法、過酸化水素電極を用いる方法等で測定し、過酸化水素およびアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、上記4の力価の測定に準じる。ただし、FAOD量は1ユニット/mlとし適当に希釈した試料を添加し、生成する過酸化水素量を測定する。過酸化水素発色系としては、パーオキシダーゼの存在下で4-アミノアンチピリン、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン等のカップラーとフェノール等の色原体との酸化縮合により発色する系を用いることができる。色原体として、フェノール誘導体、アニリン誘導体、トルイジン誘導体等があり、例えば、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N,N-ジメチルアニリン、N,N-ジエチルアニリン、2,4-ジクロロフェノール、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン等が挙げられる。又パーオキシダーゼの存在下で酸化発色を示すロイコ型発色試薬も用いることができ、そのようなロイコ型発色試薬は、当業者に既知であり、o-ジアニシジン、o-トリジン、3,3-ジアミノベンジジン、3,3,5,5-テトラメチルベンジジン、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-ビス(ジメチルアミノ)ピフェニルアミン、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン等が挙げられる。

#### (2) 酸素の消費量に基づく方法

反応開始時の酸素量から反応終了時の酸素量を差し引いた値(酸素消費量)を測定し、酸素消費量とアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、上記4の力価の測定に準じて行う。但し用いるFAOD量は1ユニット/mlとし、適当に希釈した試料を添加し吸収される酸素量を求める。

【0032】本発明方法は試料溶液をそのまま用いて行うこともできるが、対象となる糖化タンパクによっては、あらかじめ糖が結合したバリリン及び/又はリジン残基を遊離させてから行うことが好ましい。そのような目的には、タンパク質分解酵素を用いる場合(酵素法)と、塩酸等の化学物質を用いる場合(化学法)があるが、前者が好ましい。その場合、本発明方法には当業者に既知である、エンド型及びエキソ型のタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)を用いることができる。エンド型

のプロテアーゼには、例えばトリプシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、スブチリシン、プロティナーゼK、パパイン、カテプシンB、ペプシン、サーモリシン、プロテアーゼXIV、リジルエンドペプチダーゼ、プロレザー、プロメラインF等がある。一方、エキソ型のプロテアーゼにはアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ等が挙げられる。酵素処理の方法も既知であり、例えば下記実施例に記載の方法で行うことができる。

【0033】上記のごとく、本発明のFAODは、フルクトシルバリリンに高い特異性を有することから、糖化ヘモグロビンの測定に有用である。また、糖化タンパクに含まれるフルクトシルリジンにも高い基質特異性を有することから、血液試料中の糖化タンパクを測定することを含む、糖尿病の診断などに有用である。なお、検体として血液試料(全血、血漿または血清)を用いる場合、採血した試料をそのまま、あるいは透折等の処理をした後用いる。さらに、本発明方法に用いるFAOD、パーオキシダーゼ等の酵素は、溶液状態で用いてもよいが、適当な固体支持体に固定化してもよい。例えば、ビーズに固定化した酵素をカラムに充填し、自動化装置に組み込むことにより、臨床検査など、多数の検体の日常的な分析を効率的に行うことができる。しかも、固定化酵素は再使用が可能であることから、経済効率の点でも好ましい。さらには、酵素と発色色素とを適宜組み合わせ、臨床分析のみならず、食品分析にも有用なアマドリ化合物の分析のためのキットを得ることができる。

【0034】酵素の固定化は当該技術分野で既知の方法により行うことができる。例えば、担体結合法、架橋化法、包括法、複合法等によって行う。担体としては、高分子ゲル、マイクロカプセル、アガロース、アルギン酸、カラギーナン、などがある。結合は共有結合、イオン結合、物理吸着法、生化学的親和力を利用し、当業者既知の方法で行う。固定化酵素を用いる場合、分析はフロー又はバッチ方式のいずれでもよい。上記のごとく、固定化酵素は、血液試料中の糖化タンパクの日常的な分析(臨床検査)に特に有用である。臨床検査が糖尿病診断を目的とする場合、診断の基準としては、結果を糖化タンパク濃度として表すか、試料中の全タンパク質濃度に対する糖化タンパク質の濃度の比率(糖化率)又はフルクトシルアミン量で表される。全タンパク質濃度は、通常の方法(280nmの吸光度、ブラッドフォード法、ビュレット法、Lowry法あるいは、アルブミンの自然蛍光、ヘモグロビンの吸光度など)で測定することができる。

【0035】本発明はまた、本発明のFAODを含有するアマドリ化合物の分析試薬又はキットを提供するものである。本発明のアマドリ化合物の定量のための試薬は、本発明のFAOD、好ましくはpH6.0~9.0、より好ましくはpH7.5の緩衝液からなる。該FAO

Dが固定化されている場合、固体支持体は高分子ゲルなどから選択され、好ましくはアルギン酸である。試薬中のFAODの量は、終点分析を行う場合、試料あたり、通常1~100ユニット/ml、緩衝液はリン酸カリウム(pH 7.5)が好ましい。過酸化水素の生成量に基づいてアマドリ化合物を定量する場合、発色系としては、先述の「(1) 過酸化水素発生量に基づく方法」に記載の酸化縮合により発色する系、並びにロイコ型発色試薬等を用いることができる。本発明のアマドリ化合物の分析試薬と、適当な発色剤ならびに比較のための色基準あるいは標準物質を組み合わせてキットとすることもできる。そのようなキットは、予備的な診断、検査に有用であると考えられる。上記の分析試薬及びキットは、生体成分中の糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトシルアミンを定量するために用いられるものである。以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

#### 【0036】

##### 【実施例】

**実施例1** ペニシリウム・ヤンシネルムS-3413由来のFAODの製造および精製  
ペニシリウム・ヤンシネルムS-3413 (FERM BP-5475; *Penicillium janthinellum* S-3413) をFZL 0.5%、グルコース 1.0%、リン酸二カリウム0.1%、リン酸一ナトリウム 0.1%、硫酸マグネシウム0.05%、塩化カルシウム 0.01%、イーストエキス 0.2%を含有した培地(pH 6.0)10Lに接種し、ジャーファーマンターを用いて通気量2L/分、攪拌速度500rpmの条件で28℃、36時間攪拌培養した。培養物は濾過して集めた。菌糸体410g(湿重量)を、0.1mMのDTTを含む、0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)800mlに懸濁し、ダイノ・ミルにより菌糸体を破碎した。破碎液を9,500rpmで20分間遠心分離し、得られた液を粗酵素液(無細胞抽出液)とし、以下の方法で精製した。粗酵素液に40%飽和になるように硫酸アンモニウム(以下、硫酸と略す)を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。得られた上清に75%飽和になるように硫酸を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。沈殿を0.1mMのDTTを含有する50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)(以下、緩衝液Aと略す)に溶解した。得られた酵素溶液を緩衝液Aに対し一晩透析した。外液の交換は2回行った。透析後の酵\*

3mM N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4

-ビス(ジメチルアミノ)ピフェニルアミン溶液

60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液

0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)

25ユニット/ml FAOD溶液

蒸留水で全量を1mlとした。25ユニット/ml FAOD溶液は、実施例1の方法で得たFAODを25ユニッ

\* 素溶液は緩衝液Aで平衡化したDEAEセファセルラム(4.2×26cm)にアプライした。活性画分は同緩衝液による洗浄画分に認められたので、これを集め、0-55%飽和の硫酸分画に供した。次に25%飽和硫酸を含む緩衝液Aで平衡化したフェニルセファース6FF (Low Substitute) カラム(HR10/10)に吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫酸濃度25-0%飽和の直線勾配で溶出した。活性画分を集め、硫酸濃縮後、得られた酵素溶液を0.1mM DTTを含む0.2Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)にて平衡化したスーパーデックス200pgカラムによりゲル濾過を行い、70~100ユニットの精製酵素を得た。

【0037】精製酵素のUV吸収スペクトルを図6に示す。図6は、本酵素がフラビン酵素であることを示している。得られた精製酵素標品はSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動)により分子量を決定した。SDS-PAGEは、デービスの方法に従い、10%ゲルを用いて、40mAで3時間泳動し、クマシーブリリアントブルーG-250でタンパク染色を行った。標準タンパクとしてホスホリラーゼB、牛血清アルブミン、オボアルブミン、カルボニックアンヒドラーゼ、大豆トリプシンインヒビターを同様に泳動し、検量線から分子量を求めた結果、サブユニットの分子量は約48,700(48.7kDa)であることが示された(図5)。また、スーパーデックス200pgによるゲルろ過による分子量測定では、図4の検量線図から明らかなように、約38,700(38.7kDa)であった。本実施例で調製したFAODの酵素活性、pHおよび温度安定性、金属および阻害物質による影響などに関しては、前記の値または性質を示した。

#### 【0038】実施例2 糖化ヘモグロビン量の測定

##### 1) 試料の処理

0~15mgのグリコヘモグロビンコントロールE(シグマ社)を100μlの蒸留水で溶解した。これらの試料に塩酸アセトン(1N塩酸/アセトン:1/100)1mlを加え、12000回転で10分間遠心分離した。沈澱物をジエチルエーテル500μlで洗浄し、減圧乾固した。さらに8M尿素100μlを加え、20分間沸騰水中で加熱後冷却し、5.4ユニット/ml トリプシン300μlと混合、37℃で3時間インキュベートした。その後、沸騰水中で5分間加熱し、試料を調製した。

##### 2) 活性測定

FAOD反応液は以下のようにして調製した。

30μl

30μl

300μl

5μl

ト/mlになるよう、0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)で希釈して調製した。このFAOD反応液に

上記の各処理基質を150 $\mu$ l加え、30℃でインキュベートし、30分後の727nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られる糖化ヘモグロビンの量と吸光度との関係を図7に示す。図中の縦軸は727nmの吸光度(過酸化水素の量に対応)、横軸は糖化ヘモグロビンの量を表す。図は、糖化ヘモグロビンの量と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

### 【0039】実施例3 糖化ヘモグロビン量の測定

#### 1) 試料の処理

30mgのグリコヘモグロビンコントロールE(シグマ社) 10  
を蒸留水200 $\mu$ lで溶解し、8M尿素、0.2%ED \*

3mM N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-

ビス(ジメチルアミノ)ピフェニルアミン溶液

60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液

0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)

25ユニット/ml FAOD溶液

処理試料

蒸留水で全量を900 $\mu$ lとした。25ユニット/ml  
FAOD溶液は、実施例1の方法で得たFAODを25  
ユニット/mlになるよう、0.1M リン酸カリウム緩  
衝液(pH 7.5)で希釈して調製した。このFAOD反  
応液を30℃でインキュベートし、30分後の727nm  
における吸光度を測定した。この方法で得られる糖化ヘ  
モグロビンの量と吸光度との関係を図8に示す。図中の  
縦軸は727nmの吸光度(過酸化水素の量に対応)、横軸  
は糖化ヘモグロビンの量を表す。図は、糖化ヘモグロビ  
ンの量と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示し※

基質試料

500ユニット/ml アミノペプチダーゼ溶液

1.0M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)

これらを混合し、蒸留水で全量を200 $\mu$ lとした。こ  
の混合液を30℃で30分間インキュベートした。その  
後、10%トリクロロ酢酸を200 $\mu$ l加えて攪拌し、  
0℃で20分間静置した後12000回転で10分間遠★

3mM N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-

ビス(ジメチルアミノ)ピフェニルアミン溶液

60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液

0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)

16ユニット/ml FAOD溶液

蒸留水で全量を2.6mlとした。16ユニット/ml F  
AOD溶液は、実施例1の方法で得たFAODを16ユ  
ニット/mlになるよう、0.1M リン酸カリウム緩衝  
液(pH 7.5)で希釈して調製した。FAOD反応液を  
30℃で2分間インキュベートした後、上記の各処理基  
質を400 $\mu$ l加え、さらに30分インキュベートした  
後の727nmにおける吸光度を測定した。この方法で  
得られる基質のヘモグロビンA1c値と吸光度との関係  
を図9に示す。図中の縦軸は727nmの吸光度(過酸化水  
素の量に対応)、横軸はヘモグロビンA1c値を表す。図  
は、ヘモグロビンA1c値と過酸化水素発生量が相関関

\*TA・2ナトリウムを含む570mMトリス-塩酸緩衝  
液(pH 8.8)1mlと、2-メルカプトエタノール40  
 $\mu$ lを添加し、窒素封入下で2時間静置した。その後、  
1Mのヨード酢酸ナトリウム400 $\mu$ lを添加し、30  
分間静置後、2-メルカプトエタノール40 $\mu$ lを添加  
した。0.1M重炭酸アンモニウムに対して透析した  
後、10mg/ml TPCK-トリプシン10 $\mu$ lと混合  
し、37℃で3時間インキュベートした。その後、沸騰  
水中で5分間加熱し試料を調製した。

#### 2) 活性測定

FAOD反応液は以下のようにして調製した。

3mM N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-

ビス(ジメチルアミノ)ピフェニルアミン溶液

60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液

0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)

25ユニット/ml FAOD溶液

処理試料

30 $\mu$ l

30 $\mu$ l

300 $\mu$ l

10 $\mu$ l

0~13.2mg

※ている。

### 【0040】実施例4 ヘモグロビンA1c値の測定

ヘモグロビンA0試薬(シグマ社)を蒸留水で2.3mM  
になるように溶解した。この溶液を自動グリコヘモグロ  
ビン測定装置(京都第一科学)を用いて分画し、ヘモグロ  
ビンA1c画分とヘモグロビンA0画分を分取、精製し  
た。両画分を比率混合することにより、ヘモグロビンA  
1c値0%~52.0%の基質試料を得た。1) 試料の  
処理

250 $\mu$ g

5 $\mu$ l

15 $\mu$ l

★心分離を行った。得られた上清に5N NaOHを約4  
0 $\mu$ l加え、中性溶液にした。2) 活性測定FAOD反  
応液は以下のようにして調製した。

3mM N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-

ビス(ジメチルアミノ)ピフェニルアミン溶液

60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液

0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)

16ユニット/ml FAOD溶液

100 $\mu$ l

100 $\mu$ l

1000 $\mu$ l

15 $\mu$ l

係にあることを示している。

### 【0041】

【発明の効果】本発明のFAODは、フルクトシルバリ  
ンおよびフルクトシルリジンのいずれにも特異的に作用  
する。従って、新たな臨床分析および食品分析法の開発  
に有用であり、糖尿病の診断や食品の品質管理の面で寄  
与するところが大い。特に、血中の糖化タンパク量及  
び/又は糖化率又はフルクトシルアミン量を指標とし  
て、糖尿病の病状の診断に役立つと考えられる。また、  
本発明のFAODを用いるアマドリ化合物の分析試薬お  
よび分析方法によって、正確に糖化タンパクを定量する

ことができ、糖尿病の診断、症状管理に貢献することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 FAODの培養培地での産生量と培養時間の関係を示すグラフ。

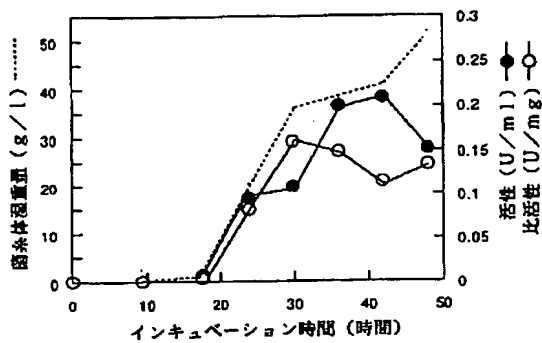
【図 2】 FAODの溶媒中での活性と至適 pH の関係を示すグラフ。

【図 3】 FAODの溶媒中での活性と至適温度の関係を示すグラフ。

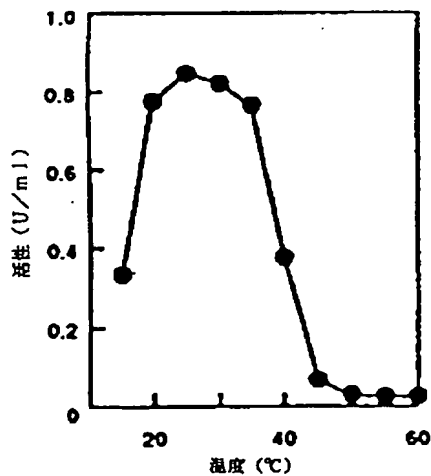
【図 4】 スーパーデックス 200pgを用いたゲルろ過 10 による分子量測定の結果を示すグラフ。

【図 5】 ペニシリウム・ヤンシネルム S-3413 由\*

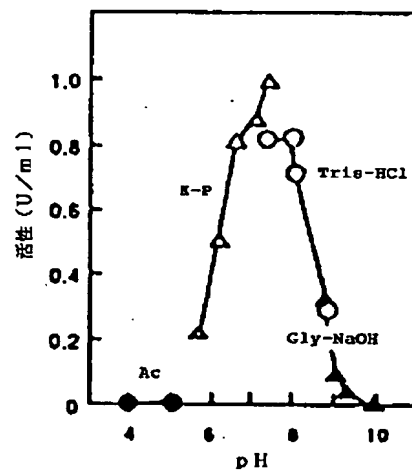
【図 1】



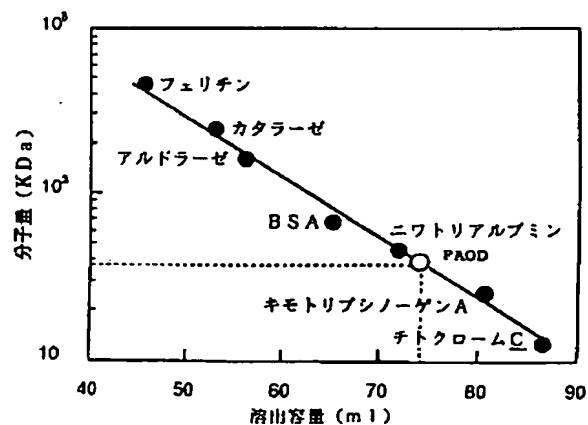
【図 3】



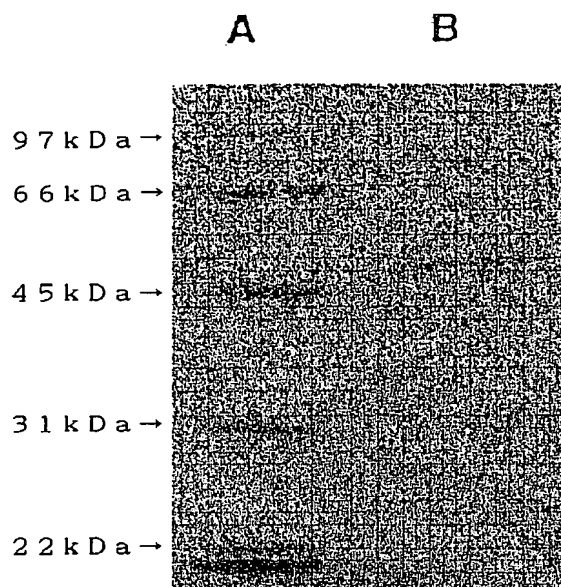
【図 2】



【図 4】

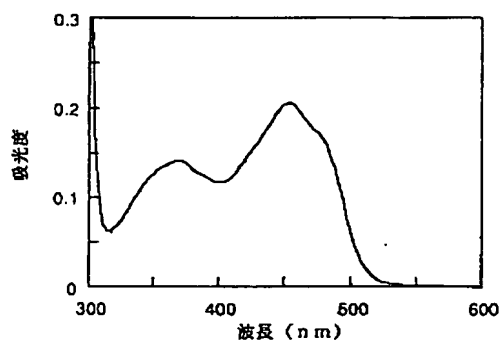


【図5】

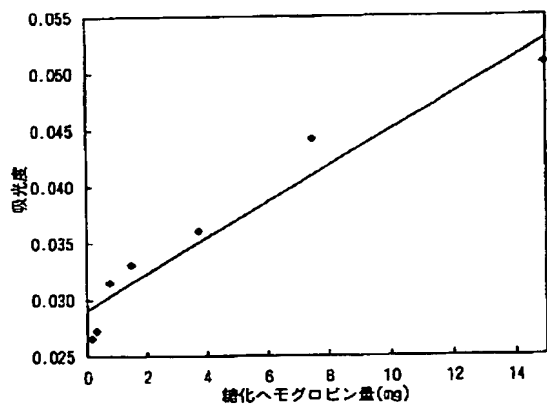


A : 分子量マーカー  
B : 精製FAOD

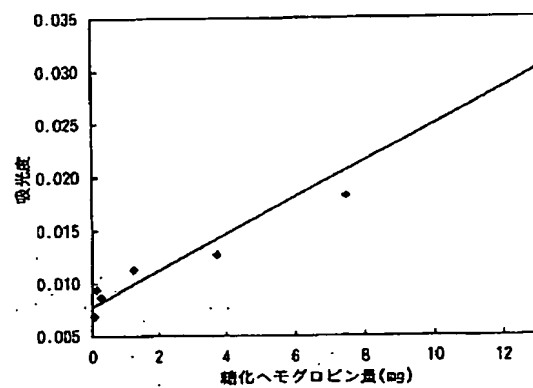
【図6】



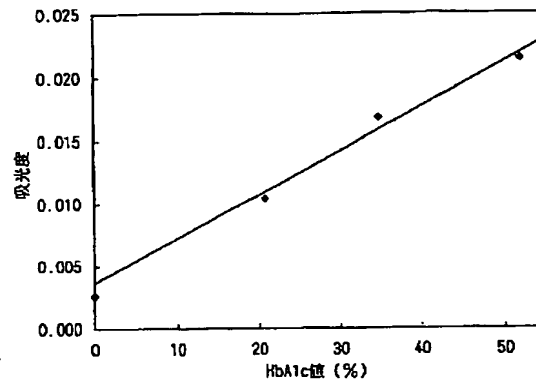
【図7】



【図8】



【図 9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 N 9/06  
C 1 2 R 1:82)

(72) 発明者 八木 雅之

京都府京都市右京区西京極三反田町 1 西  
京極団地 4 棟 302 号室

(72) 発明者 船津 文代

大阪府枚方市茄子作 4 丁目 40 番地の 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**